

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 44 33 130 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/85
C 12 N 5/10
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53

DE 44 33 130 A 1

②1 Aktenzeichen: P 44 33 130.4
②2 Anmeldetag: 16. 9. 94
④3 Offenlegungstag: 21. 3. 96

⑦1 Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Müller-Boré & Partner, 81671 München

⑦2 Erfinder:

Bürkle, Alexander, Dr., 69180 Leimen, DE; Küpper,
Jan-Heiner, Dr., 69256 Mauer, DE; Gool, Léon van,
69123 Heidelberg, DE; zur Hausen, Harald, Prof.
Dr.med. Drs.h.c., 69493 Hirschberg, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Identifizierung von DNA-schädigenden Substanzen durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase überexprimierende Zelllinien

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein DNA-Konstrukt, das eine cDNA-Sequenz für menschliche Poly(ADP-Ribose)-Polymerase enthält, Zelllinien, die das DNA-Konstrukt enthalten und ein Verfahren zur Identifizierung von DNA-schädigenden Substanzen anhand dieser Zelllinien, die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase überexprimieren.

DE 44 33 130 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein DNA-Konstrukt, das eine cDNA-Sequenz für menschliche Poly (ADP-Ribose)-Polymerase enthält, Zelllinien, die das DNA-Konstrukt enthalten und ein Verfahren zur Identifizierung von DNA-schädigenden Substanzen anhand dieser Zelllinien, die Poly (ADP-Ribose)-Polymerase überexprimieren

Bisher wurden DNA-schädigende Substanzen (physikalische und chemische Kanzerogene), die DNA-Strangbrüche herbeiführen durch die Messung der Strangbrüche entweder in Zellysaten durch alkalische DNA-Denaturierungsverfahren (z. B. "Alkalische Elution") oder in situ anhand von Einzelzellen (sog. "Kometenassay") identifiziert. Die Lysat-Tests hatten aber den Nachteil, technisch relativ aufwendig zu sein und eine hohe manuelle Geschicklichkeit des Experimentators zu erfordern. Bei "Kometenassays" kommt hinzu, daß die Ablesung mikroskopisch erfolgt, was einen hohen apparativen Aufwand bedingt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren zur schnellen, zuverlässigen Identifizierung von chemischen Kanzerogenen bereitzustellen.

Das Prinzip der vorliegenden Erfindung beruht darauf, die zelluläre Poly (ADP-Ribose)-Produktion als Indikator für in lebenden Zellen auftretende DNA-Strangbrüche nachzuweisen. Die Poly (ADP-Ribose) wird von der Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen und unter Verbrauch von NAD^+ synthetisiert. Dies geschieht unter Einfluß von kanzerogenen Substanzen fast in jeder kernhaltigen Zelle. Jedoch wird in einer solchen Zelle durch Manipulation, d. h. durch Einbringung einer PARP-DNA-Sequenz in einer bestimmten Kombination mit einem Promotor, besonders viel Poly (ADP-Ribose) gebildet und kann durch geeignete Meßmethoden, beispielsweise Immunfluoreszenz, nachgewiesen werden.

Ein Beispiel für ein Konstrukt, das die PARP-DNA-Sequenz enthält, ist das bei der DSM unter der Nummer DSM 9430 am 13. September 1994 hinterlegte Plasmid pPARP31.

pPARP31 kann durch folgende Schritte erhalten werden:

a) Ligierung einer cDNA, die den vollständigen offenen Leserahmen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aus menschlichen embryonalen Fibroblasten (HEF-Zellen) enthält, in pBluescript unter Erhalt des Plasmids pPARP 25 (Küpper, Dissertation Universität Heidelberg, 1990). Der vollständige offene Leserahmen einer der bekannten PARP-cDNAs ist z. B. in der GenBank/-EMBL-Datenbank, Zugangsnummer J 03473 (Kurosaki) veröffentlicht.

b) Isolierung des Xho/Xba-Fragments aus pPARP25

c) Herstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pL15TK

Zuerst wird das 650 bp HincII/Avall-Fragment des Humanen-Cytomegalie-Virus-Promotor/Enhancer (HCMV Prom), das über geglättete Enden verfügt, in die geglättete EcoRI-Schnittstelle von pUC19 ligiert, wodurch der "Zwischenvektor" pL15 erhalten wird. In die geglättete SphI-Schnittstelle und in die HindIII-Schnittstelle von pL15 wird dann das 629 bp SmaI/HindIII-Fragment des Poly-Adenylierungssi-

gnals des Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Gens (TK poly A) ligiert, wodurch der Vektor pL15TK erhalten wird. Der Vektor pL15TK enthält das Resistenzgen für Ampicillin (Amp), einen bakteriellen Replikationsorigin (ori), sowie Teile des Lac-Operons (Z und i). Die Polylinker-Kassette von pUC 19 ist bis auf die EcoRI- und SphI-Schnittstellen intakt.

d) Ligierung des Xho/Xba-Fragments aus pPARP25 in den Vektor pL15TK (wie in Fig. 2 gezeigt) unter Erhalt des Plasmids pPARP31 (s. Fig. 3), wobei die XhoI-Schnittstelle des Inserts und die BamHI-Schnittstelle des Vektors zerstört werden. Die XbaI-Schnittstellen des Vektors und des Inserts bleiben intakt.

Zur Erzeugung von Zelllinien wird die embryonale Hamsterzelllinie CO60 (Lavi, PNAS 78, S. 6144 ff (1981)) mit einem Plasmid, das eine Poly (ADP-Ribose)-Polymerase exprimiert, vorzugsweise pPARP 31, stabil transfiziert. Die dabei erhaltenen Zellklone (im Falle der Verwendung von pPARP31 wurden diese Zellklone COCF1, -2, -4 genannt) überexprimieren die menschliche PARP. Diese Klone produzieren bei gleicher gentoxischer Behandlung (z. B. γ -Strahlung oder Einwirkung von kanzerogenen Chemikalien) deutlich mehr Poly (ADP-Ribose) als parallel isolierte Kontrollklone (COCFN1, -2, -4), die keine Explosion der menschlichen PARP aufweisen. Ähnliche PARP-überexprimierende Zelllinien können natürlich auch aus anderen bekannten Basis-Zelllinien außer der verwendeten Hamsterzelllinie erzeugt werden. Desweiteren können PARP-überexprimierende Zelllinien auch nach transients Transfektion mit einem PARP-exprimierenden Plasmid erhalten werden.

Die Hamsterzellklone COCF1, COCF2 und COCF4 sowie die Kontrollzelllinie COCFN1 wurden bei der DSM unter den Nummern ACC2186, ACC2187, ACC2188 bzw. ACC2189 am 6. Sept. 1994 hinterlegt.

Durch die Verwendung der COCF-Klone bzw. dazu gleichartiger Klone aus anderen Zelllinien als Indikatorzellen wird die Empfindlichkeit eines Nachweisverfahrens für Kanzerogene, die DNA-Strangbrüche erzeugen, deutlich gesteigert. Durch die zelluläre Synthese von Poly (ADP-Ribose) kommt es gleichsam zu einer Signalverstärkung, da ein einzelner DNA-Strangbruch zur Synthese von mehreren oder gar vielen Polymermolekülen führt, die mit bis zu 200 monomeren Bausteinen eine beträchtliche Komplexität erreichen. Durch Transfektion des die PARP-Sequenz enthaltenden Expressionskonstrukts, vorzugsweise pPARP31, wird die Polymersynthese weiter gesteigert. Darüberhinaus kann die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens dadurch weiter erhöht werden, daß die Zellen kurz vor der Einwirkung der Testsubstanz einem definierten Hitzeschock, z. B. 30 Minuten 45°C , unterworfen werden, wodurch der Abbau der Poly (ADP-Ribose), der mit der Synthese konkurrieren kann, gehemmt wird. Der Nachweis der zellulär gebildeten Poly (ADP-Ribose) erfolgt vorzugsweise immunologisch. Dies hat den Vorteil, daß die Schritte leicht ausführbar sind und die Methode mit einem Zeitaufwand von wenigen Stunden schnell durchführbar ist. Vorzugsweise erfolgt der Test mittels Fluoreszenzmikroskopie oder auf Mikrotiterplatten, wo sich die spezifische Antikörperbindung im Sinne eines ELISAs durch automatisierte Vermessung auswerten läßt. Jedoch eignen sich auch alle anderen gängigen immunologischen Detektionsverfahren, wie z. B. Immunozyto-

chemie oder Immunodotblot. Bei letzterem Verfahren werden die Zellen nach Behandlung mit der DNA-schädigenden Testsubstanz lysiert, die Lysate werden auf einen Träger, z. B. eine Filtermembran, aufgebracht und die gebildete Poly (ADP-Ribose) wird mit einem Poly(ADP-Ribose)-spezifischen Antikörper nachgewiesen, der Enzym-markiert sein kann. Andererseits kann vorstehender Antikörper unmarkiert sein. Der Nachweis erfolgt dann durch einen zweiten, gegen vorstehenden Antikörper gerichteten Antikörper, der markiert ist, z. B. Enzym-markiert.

Beispielhaft sei der Nachweis von Poly (ADP-Ribose) durch Immunfluoreszenz beschrieben. Zuerst läßt man die das PARP-DNA-Konstrukt enthaltenden Zellen auf z. B. Deckgläschen oder Mikrotiterplatten auf eine übliche Zelldichte anwachsen. Dann erfolgt die Behandlung der Zellen mit einer DNA-schädigenden Testsubstanz. Die Behandlungszeit ist für einzelne Testsubstanzen unterschiedlich. Sie kann vom Fachmann leicht bestimmt werden. Vielfach ist die Behandlungszeit 1–15 Minuten. Danach werden die Zellen an den Träger (z. B. Deckgläschen oder Mikrotiterplatte) fixiert. Nach Waschen des Trägers, kurzem Trocknen und Rehydrieren der Zellen in Puffer erfolgt die Inkubation mit einem Erst-Antikörper gegen Poly (ADP-Ribose). Nach mehrmaligem Waschen mit Puffer erfolgt die Inkubation mit einem markierten, gegen den Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper. Nach wiederholtem Waschen erfolgt die fluoreszenzmikroskopische Auswertung oder die Detektion in einem ELISA-Lesegerät.

Als DNA-schädigende Testsubstanz eignen sich z. B. γ -Strahlung, Medikamente, wie Zytostatika, UV-Licht, Nahrungsmittelzusatzstoffe oder Chemikalien wie Farbstoffe, Lösungsmittel oder Reinigungsmittel.

Das beschriebene Prinzip der PARP-Überexpression läßt sich ohne weiteres auch auf primäre Zellen aus Versuchstieren ausweiten, indem die Expressionskassette für menschliche PARP mit Hilfe eines viralen Vektors transient oder stabil in solche Primärzellkulturen eingeschleust wird. Dadurch stehen Zellen mit der vollen, gewebespezifischen Fremdstoff-Metabolisierungskapazität zur Verfügung. Einerseits erlaubt dies die Detektion von Agentien, die erst nach der Metabolisierung die DNA schädigen, andererseits läßt sich mit solchen Zellen ein organspezifisches Schädigungspotential abschätzen.

Die Erfindung wird anhand der Figuren weiter beschrieben, von denen

Fig. 1 den eukaryotischen Expressionsvektor pL15TK zeigt,

Fig. 2 das Klonierungsschema für pPARP31 zeigt und

Fig. 3 die Genkarte des Plasmids pPARP31 zeigt.

Die Abkürzungen in den Figuren bedeuten:

HCMV Prom: Humaner Cytomegalie-Promotor/Enhancer
AMP: Ampicillin-Resistenzgen
Z: Teil des Lac-Operons
I: Teil des Lac-Operons
(TK) Poly A: Polyadenylierungssignal des Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Gens
ori: bakterieller Replikationsursprung
D: DNA-Bindungsdomäne
A: Automodifikationsdomäne
N: NAD-Bindungsdomäne
ATG: Initiationskodon
Stop: Stopkodon

Für die Restriktionsschnittstellen wurden die üblichen Abkürzungen verwendet.

Beispielhaft sei auf das nachfolgende Beispiel verwiesen, das die Erfindung weiter erläutert.

BEISPIEL

COCF1-Zellen wurden über Nacht auf Deckgläschen angezüchtet. Die Zellen wurden mit 2,8–20 Gray Gamma-Strahlung behandelt. Fünf Minuten nach Bestrahlungsbeginn erfolgte die Fixierung der Zellen in 10% Trichloressigsäure (10 Min. auf Eis). Die Deckgläschen wurden für jeweils 3 Minuten in 70%, 90% und absolutem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknen für 1 Minute wurden die Zellen in PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung) für 1 Minute rehydriert. Es erfolgte die Zugabe des Erst-Antikörpers (Zellkulturüberstand des Hybridoms 10H [beschrieben von Kawamitsu et al., Biochemistry 23, 3771 ff., 1984], das einen monoklonalen, hochspezifischen Antikörper gegen Poly (ADP-Ribose) sezerniert). Danach wurden die Deckgläschen dreimal 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen und der Zweit-Antikörper (FITC-gekoppelte Ziegen-anti-Maus-Immunglobuline; Fa. Renner, Dannstadt) wurde zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde wieder dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und die Deckgläschen wurden in Polyvinylalkohol auf Objektträger eingebettet. Es erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

Patentansprüche

- 1) Plasmid pPARP31 (DSM 9430, hinterlegt am 13. Sept. 1994).
- 2) Poly (ADP-Ribose)-Polymerase überexprimierende Zelllinie, umfassend ein DNA-Konstrukt mit einer Nukleinsäuresequenz für menschliche PARP.
- 3) Zelllinie nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz eine cDNA-Sequenz ist.
- 4) Zelllinie nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Konstrukt pPARP31 ist.
- 5) Zelllinie nach einem der Ansprüche 2–4, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Hamster-Zelllinie, insbesondere CO60 ist.
- 6) Zelllinie nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die Zellklone COCF1 (DSM ACC2186, hinterlegt am 6. Sept. 1994), COCF2 (DSM ACC2187, hinterlegt am 6. Sept. 1994) und COCF4 (DSM ACC2188, hinterlegt am 6. Sept. 1994) handelt.
- 7) Verfahren zur Identifizierung von DNA-schädigenden Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen, die Poly (ADP-Ribose) überexprimieren, entweder (a) auf einem Träger wachsen gelassen werden, einer DNA-schädigenden Testsubstanz ausgesetzt werden und die gebildete Poly (ADP-Ribose) immunologisch nachgewiesen wird, oder (b) einer DNA-schädigenden Testsubstanz ausgesetzt werden, lysiert werden und die Lysate auf einen Träger aufgebracht werden sowie die gebildete Poly (ADP-Ribose) immunologisch nachgewiesen wird.
- 8) Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Zellen der Zellklone COCF-1 (DSM ACC2186), COCF-2 (DSM ACC2187) oder COCF-4 (DSM ACC2188) handelt.

9) Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger in (a) ein Deckgläschen oder eine Mikrotiterplatte ist und in (b) eine Filtermembran ist.

10) Verfahren nach einem der Ansprüche 7—9, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologische Nachweis in (a) über Fluoreszenzmikroskopie geschieht.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

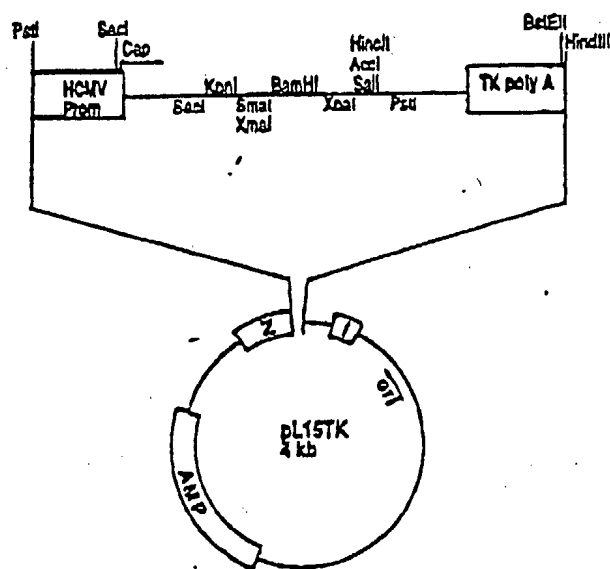
55

60

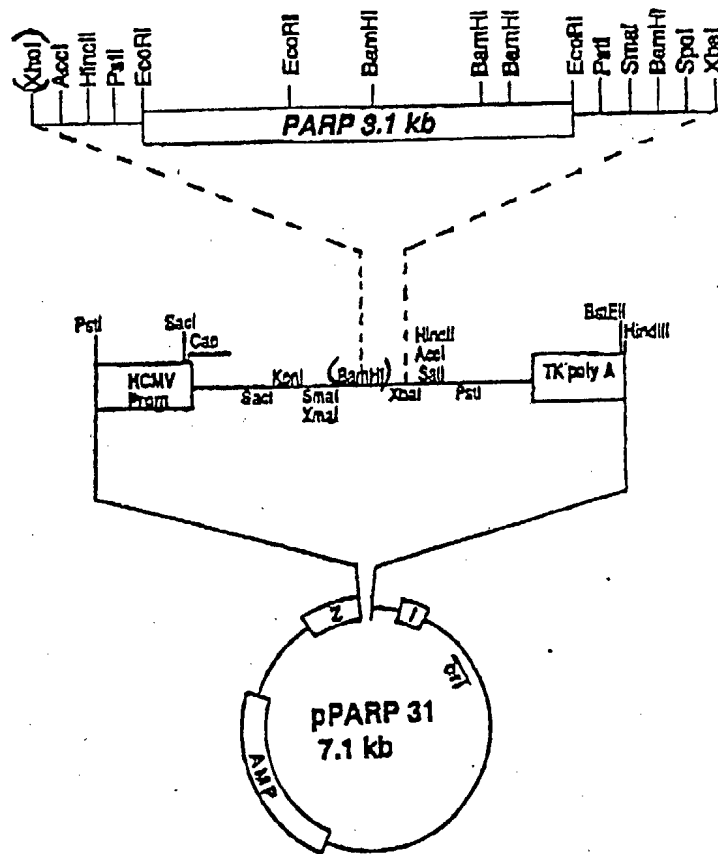
65

- Leerseite -

FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3

ad 5. Genkarte des Plasmids pPARP31

